

(19) Országkód:

**HU**



MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG  
ORSZÁGOS  
TALÁLMÁNYI  
HIVATAL

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

**SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY**

(21) A bejelentés száma: 1484/88

(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 23.

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(11) Lajstromszám:

**210 122 B**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**A 61 K 35/60**

**A 61 K 31/20**

**A 61 K 33/04**

**A 61 K 35/72**

(72) Feltaláló:

A feltalálók nevük feltüntetésének mellőzését kérték,  
(HU)

(73) Szabadalmas:

BIOREX Kutató-Fejlesztő Kft., Budapest (HU)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi  
Iroda, Budapest

(54) Eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható  
gyógyászati készítmény előállítására

### **(57) KIVONAT**

A találmány a szívre és a keringési rendszer trombo-embolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy 0,5–50 tömeg%-ban szeléntartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5-

0,5 tömeg% 18–24-szénatomos, legalább két ketidő kötést tartalmazó egy vagy több telítetlen zsírsavat kívánt esetben adalékanyagokkal és antioxidánsnal együtt és ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítanak.

A találmány tárgya eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmény előállítására.

Ismeretes, hogy a  $C_{18-24} \omega-3$  telítetlen zsírsavak előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Közülük is kiemelkedő jelentőségű az eikozapentaénsav /EPA/ és a dokozahexaénsav /DHA/. E két sav fontosságára és sokrétű biológiai hatására mutatnak rá közleményükben Dyerberg és munkatársai (The Lancet, 15, 117 /1978/).

A politeltetlen zsírsavak, ezen belül elsősorban az EPA és a DHA hiperlipidémiában és trombózis meg-betegedésekben játszott fontos szerepével kapcsolatos hatásokat írják le összefoglaló jelleggel Goodnight és munkatársai (Arteriosclerosis 2, 87 /1982/ Review).

Hatóanyagként EPA-t és DHA-t tartalmazó gyógy-szerkészítményeket ismertet például a 3 438 630 sz. német szabadalmi leírás elsősorban a vér koleszterinszintjének csökkentésére, továbbá az 5 808 037 és a 6 049 097 sz. japán közrebecsítési iratok szívbetegségekben szenvedőknél trombus kialakulásának megelőzése és agyérlelmeszedés ellen.

Számos közlemény foglalkozik még az EPA és a DHA vérlemezkék aggregációjáról és így trombusképződést gátoló hatásával, így például Spencer és Caraaga (Prostagl. Leukotrienes and Med. 23, 129 /1986/) és Knapp és munkatársai (New Engl. Journ. of Med. 314, 937 /1986/).

Az EPA és a DHA vírusellenes hatását ismerteti a 4 513 008 sz. USA-beli szabadalmi leírás.

A halolaj aktív komponensei, így az EPA és a DHA a PG-3 sorozat bioszintézisénél prekurzorként szerepelnek, egyben gátolják az arachidonsavból kiinduló bonyolult biokémiai folyamatok láncolata, az ún. „arachidonsav-kaszckád” során keletkező káros hatású metabolitok, mint például a TXA<sub>2</sub> és a TXB<sub>2</sub> képződését.

A politeltetlen zsírsavak számos kedvező hatás mellett azzal a hátrányos patológiai tulajdonsággal rendelkeznek, hogy az emberi szervezetben spontán oxidációs mechanizmusú bomlást szennyeznek aktív aldehydek, többek közti a szervezetre káros malonaldehyid keletkezése közben. Ezek az aldehydek elsősorban a kötőszövetekkel élettanilag káros reakciókba léphetnek, ami ún. „ceroid lipofuscinosis”-hoz vezethet.

Autóbbi évtizedben kezdték foglalkozni a kutatók a mikroelemek és nyomelemek élettani hatásával. Így ismertetéssel vált, hogy a szelén az élet egyik legfontosabb, nélkülözhetetlen anyaga. A szelén kedvező hatása főként azon alapszik, hogy aktiválja a glutation-peroxidázit, pontosabban annak prosztetikus csoportját, amely a káros peroxidációs folyamatok legfontosabb endogén gátlója.

A szelén önmagában hatásos vérnyomáscsökkenő anyag, javítja a szív isémiai, hipoxiás és infarktusos állapotát, megakadályozza a központi idegrendszer cereális lipidtranszferációját. Hatását, például a magas kérgegulladás/ esetén is. Rákellenes hatása jelentős, bizonyítottan csökkenti a rák kialakulásának lehetőségét. Ezenkívül mutagén inhibítorként is alkalmazható.

A szelén nem kumulálódik a szervezetben, így pót-

lásáról állandóan gondoskodni kell. Bevitelre mostanáig főleg szervetlen vegyületek, így  $SeO_2$  és  $Na_2SeO_3$  alakjában történt. Hiánya májnekrózist, izomelhalást, eritrocita membrán destruциót, kötőszöveti károsodást eredményezhet, EKG elváltozásként S-T elevációt, ezenkívül kwashiorkor betegséget, sclerosis multiplexet okozhat.

A szelén biológiai hatásairól összefoglaló cikket közzölnek Thressa és munkatársai (Nutrition Review 10 35, 7 /1977/), valamint Shamberger (J. of Env. Path. and Tox. 4, 305 /1980/ és Masukawa és munkatársai (Experientia 39, 405 /1983/).

Szerves szelén-vegyülettel egyrészt preparativ szintetikus úton nyerhetünk, ilyen megoldást ismertetnek például Klaiman és Günther: Organic Selenium Compounds, Their Chemistry and Biology /John Wiley and Sons, Inc. New York; 1973/ c. könyükben, de előállíthatók szerves szelén-vegyületek mikroorganizmusok segítségével is. Utóbbi esetben a mikroorganizmusokat szervezetlen szelén-vegyülettel dúsított tápközegen nevelik. Az erre alkalmas szervezetek a szelént felveszik és azt anyagcseréjükbe vonva szerves anyagokhoz, leggyakrabban aminosavakhoz vagy zsírokhoz kötik. Ilyen eseteket ismertetnek közleményekben Danch és

Chmielowski (Pr. Nauk. Univ. Ślask Katowice 1, 57 /1985/) és Gennity és munkatársai (Biochem. Biophys. Res. Commun. 118, 176 /1984/).

Számos olyan mikroorganizmus ismertes, amely képes egyes elemeket – így a szelént is – környezetéből összegyűjteni és szervezetében akkumulálni. A 4 530 846 sz. egyesült államokbeli szabadalmi leírás és a 60 224 451 sz. és 57 174 098 sz. japán közrebecsítési iratok szelénnel dúsított élesztőgomba előállítását írják le.

35 Az élesztő mellett egyéb mikroorganizmusok, így baktériumok, sugárgombák és fonalasgombák szelén-nel való dúsítását ismerteti a 78 148 587 sz. japán közrebecsítési irat.

A szelén tartalmú élesztőt az 58 129 954 sz. japán közrebecsítési irat szerint növényi olajokhoz keverve öregkorú megbetegdések kezelésére javasolják.

A találmány célja olyan új, a szívre és keringési rendszerre ható gyógyászati készítmény előállítása, mely lehetővé teszi a DHA és az EPA, valamint speciális mikroorganizmusok közreműködésével a szerves szelén-tartalmú természetes vegyületek előnyös tulajdonságainak egyesítését, és egyidejűleg teljes mértékben kiküszöbölli a politeltetlen zsírsavak hátrányos tulajdonságait.

50 A találmány alapja az a felismerés, hogy a fenti cél maradéktalanul elérhető, és a ceroid lipofuscinosis folyamat kiküszöbölésére alkalmas készítmény nyerhető, ha szelén-tartalmú – humán felhasználás szempontjából nem toxikus – mikroorganizmust politeltetlen zsírsavakkal együtt alkalmazunk.

A tervezett gyógyszer a környezetben történő keringési rendszerre ható gyógyászati készítmények előállítására. A találmány értelmezében úgy járunk el, hogy 0,5–50 tömeg% szeléntartalmú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg% 18–24 szénatomos,

legalább két telítetlen kötést tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kívánt esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsnal önmagában ismert módon gyógyszerkészítményre alakítunk.

A találomány szerinti eljárással célszerűn olyan készítményeket állítunk elő, melyek eikozapentaénossal /EPA/ és dokozahexaénossal /DHA/, valamint szeléntartalmú élesztőt tartalmaznak.

A készítmény egyik komponensei szolgáló  $C_{18,24}$  ω-3 telítetlen zsírsavak alapanyagaként különböző tengeri és édesvízi halakból, így elsősorban makrélából, tőkéhalból, herringból, szardíniából, tinahalból és busából, továbbá a halak májából nyerhető olajok, például a tőkéhalmajolaj /csukamajolaj/ és cápamajolaj használhatók.

A halolajok az EPA-n és a DHA-n kívül nagy mennyiségeben tartalmaznak telítetlen és kismértékben telítetlen zsírsavakat, valamint el nem szappanosítható komponenseket. Ezen alkotórészek eltávolítása igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyászati készítmények dózisának növelése érzékenyen emelne a bevitt kalóriát, valamint a vér triglycerid-szintjét. Emellett az el nem szappanosítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitamint /annak provitaminját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó készítmények nem lehetnek a kívánatos hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból eltávolítjuk a felszrolt alkotóelemeket, így a telítetlen és kismértékben telítetlen zsírsavakat, az el nem szappanosítható alkotóelemeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Ily módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölötti dúsul.

Mikroorganizmusként célszerűen olyan törzseket használhatunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi fogyasztásra alkalmasak. Ezre a céllra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Acetobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Torula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Brettanomyces* sp., *Brevibacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Oidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichospora* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Monascus* sp., *Aspergillus* sp. stb. törzsek fajai.

A találomány szerinti készítmény oxidációjának gállására aktív tartósítószereként α-ikoferoolt /E-vitamin/, glutationt vagy hagyományos antioxidánsokat, mint például butil-hidroxi-toluolt célszerű használni.

Vivő- és hordozóanyagként a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például laktózt, keményítőt vagy magnézium-sztearátot alkalmazhatunk.

A farmakológiai vizsgálati készítményt eprit séget károsító mellékhatásoktól való mentességet igazolták, mert a patkánymáj mikroszomális enzimrendszereben használatos dózis százszoros mennyiségénél sem tapasztaltunk el változást. A készítménnyel történő kezelés szignifikáns módon csökkenti a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscin mennyiségét. A találomány szerinti készítménnyel Wisztar nőstény patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyértelmű trombocita aggregáció gátlási tapasztaltunk.

5 A készítmény optimális hatásos napi dózisa 175 kg-os átlagos testtömegre számolva/ 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az élesztőpor grammonként átlagosan 40 µg szelént tartalmaz.

A találomány szerinti készítmény főbb előnyei a következők:

1. Egyesít az EPA és a DHA, valamint a szelén és az élesztő előnyös tulajdonságait.

15 2. Kiküszöböli az ismert halolajtartalmú készítmények azon káros hatásait, melyeket a telítetlen lipoid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kiküszöböli a politelítetlen zsírsavak fogyasztá-

20 sa esetén fellépő „ceroid lipofuscinosis" lehetőségét.

4. A szelént természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élesztőben feldúsítva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatását előnyösebben fejt ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban fgy először élesztőben ipari méretekben, fajlagosan nagymennyiségen és olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyászati hatást fejt ki atopikus závarok esetén, és ekcéma, asztma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus összefüggésű zavarok, például migrén, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, otitis media, nefrotikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Különösen alkalmaz a keringési rendszer zavarai, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolitikus állapotok, így agyvérzés, infarktus, fiatalkoriak Keshan-szindrómája kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

35 40 A találomány szerinti készítményhez alkalmazott ω-3 politelítetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerinti, a szelénnel dúsított mikroorganizmust pedig a 2-6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7-9. példák a találomány szerinti gyógyászati készítmények előállítását szemléltetik.

#### 1. példa :

24 kg makrélá olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter metanolban 50-60 °C közötti hőmérsékleten, keverés 50 közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot csepegtetünk hozzá, majd az eleget 60 °C-on tartva további 45 percig keverjük. Mindegy 60 °C hőmérsékleten 20 kg 15%-os sósavat adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sósavval,

55 55 mindegy 15 °C-ig forró szárvízzel semlegesítjük, majd a szerves fázisot 100 liter acetont adunk, felmelegítjük mindegy 45 °C-ra, és hozzáötünk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg LiOHxH<sub>2</sub>O-ot. Fél óra keverés után

60 éjszakán át állni hagyjuk, majd leszűrjük, és az acetó-

## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemzve*, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűen 85–75 tömeg% 18–24 szénatomos, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy vagy több zsírsavat és/vagy ezek származékeit kíváni

esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsnal önmagában ismert módon gyógyszerkészítémenyek alakítjuk.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemzve*, hogy telítetlen zsírsavként tengeri halak olajából extra-házt zsírsavakat használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemzve*, hogy telítetlen zsírsavként 5,8,11,14,17-10 eikozapentaénsvat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsvat használunk.

nos szűrletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os sósavval megsavanyítjuk és hexánnal háromszor kirázuk, majd a hexános fázist bepároljuk. A tisztítási művelet során végig N<sub>2</sub>-atmoszférában dolgozunk. Igy 6,4 kg tisztított halolajat nyerünk.

Az így tisztított makrélolaj 1 kg-ját 60 °C-on hozzácseregejtjük 3 kg karbamid 9 liter metanolral készített oldatához. Az elegendő 2 órán át ezen a hőmérsékleten keverjük. Lehűlés után éjszakán át mélyhűtőben -10 °C-on állíti hagyjuk, majd leszűrjük, és a szűrletet bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 hígítású sósavat öntünk, és 15 percig keverjük. Hexánnal kirázuk, a hexános fázist vizivel semlegesre mosunk, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-tal száritjuk, majd bepároljuk. Igy 0,34 kg ω-3 telítetlen zsírsavat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tartalom: 24%; DHA-tartalom: 42%.

#### 2. példa:

5-litres üveg palackokba 2-2 l sterilizált malátakivonatos folyékony táptalajt öntünk, és glükózzal 13% dúsítjuk. 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá, majd beoljuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőztetéssel 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában újabb 5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészthez.

Szűrés után a sejteket desztillált vizivel többször átmosunk, majd 68-70 °C-on száritjuk. Az anyagot mikronizáljuk, majd atomabszorpcióos módszerrel meghatározzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

#### 3. példa:

500 ml-es Erlemeyer-lombikokba 100 ml élesztőkivonatos folyékony tápoldatot töltünk steril körílmények között, majd 5 µg/ml mennyiségi Na-szelenitet teszünk bele, és beoljuk *Aspergillus sojae* gombával. 28-30 °C-on rázatjuk a tenyészleteket. A tenyésztsés 3. napján újabb 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrába. 5 nap eltelté után a szárazanyagot kiszűrjük, mosunk, majd a 2. példa szerinti módon száritjuk. Mikronizálás után a minta műszeresen meghatározott Se-tartalma 300 µg/g.

#### 4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Torulopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyésztsés során nyert mikrobatömeg Se-tartalma 120 µg/g.

#### 5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített tápoldaton *Streptococcus thermophilus*-t nevelünk 45 °C-on. A nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-tartalma 420 µg/g.

#### 6. példa:

A 3. példával azonos módon nevelünk *Lactobacillus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a táptalajt 1% gyümölcssel és 2% kalcium-kátralitával is kiegészítjük. A kapott baktérium 300 µg/g Se-tartalmaz.

#### 7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrélolajhoz /EPA-tarta-

lom: 24%, DHA-tartalom: 42%/ 10 g Se-élesztőpor keverjük /Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpor/. A keveréket homogenizáljuk. A homogenizátumot 0,1% E-vitaminmal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot lágy zselatin gyöngykapszulába vagy lágy zselatin kapszulába töltjük, és baborék-csomagolással szereljük ki.

#### 8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az eltéréssel, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használjuk: 400 g 65%-os dúsított tőkehalmájolaj, melynek EPA tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztőpor 120 µg/g Se-tartalommal és 0,4 mg E-vitamin. A homogenizátumot 500 mg hatóanyag befogadására alkalmas kapszulába töltjük.

#### 9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az alábbi összetételű tabletákat állítjuk elő:

20	EPA-ra és DHA-ra nézve dúsított tőkehalmáj olaj, mely 0,1% E-vitamin tartalásával (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%)	200,0 mg
25	Se-élesztő (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor)	86,0 mg
	Laktóz	140,0 mg
	Keményítő	60,0 mg
	Polivinil-pirrolidon	3,5 mg
	Magnézium-szterárt	3,5 mg
30	Kívánt esetben a tabletákat drázsírozó gépen cserkával vagy más anyaggal vonjuk be.	

A trombocita aggregáció gátló hatású Wistar albino nőstény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o. kezeléssel vizsgáltuk. Az állatok I. csoportja 67% zsírsav-származék és 33% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírsav-származék és 6% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g), a III. csoport 50% zsírsav-származék és 50% élesztő (Se-tartalom: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll) csoport 67% fiziológiai sóoldat és 33% élesztő (szélen-mentes) keverékét kapta.

A 6 hetes kezelést követően a vena cava inferiorból vért vettünk, a vérmintákat 3,5%-os Na-citráttal összekerítük, centrifugáltuk és a kapott, trombocita-dús plazmában, ADP különböző koncentrációval trombocita aggregációt idéztünk el. Azt a minimális ADP-koncentrációt, melynél az aggregáció jelentkezik ADP különböző koncentrációinak nevezük. Ennek átlagos értéke (X) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találomány szerinti kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint azzal az alábbi táblázat mutatja:

	$\bar{X}$ (µM)
I. csoport	64,5
II. csoport	52,3
III. csoport	88,5
IV. (kontroll) csoport	.....

A trombocita aggregáció gátló hatás jelentős, és 50-94% zsírsavat (vagy zsírsav-származékot) és 33-50% élesztőt (Se-tartalmú élesztő) tartalmazó kombináció esetében megfelelően bizonyított.